动 物 学 研 究 1993,14 (2): 171–177
Zoological Research

ISSN 0254–5853
CN 53–1040 / Q

鱼类远缘杂交正反交杂种胚胎发育差异的细胞遗传学分析*

桂建芳 梁绍昌 朱蓝菲 孙建民 蒋一珪
(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要 本文报道了鲤(*Cyprinus carpio*)♀×鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)♂、鲫(*Carassius auratus*)♀×鲢♂、白鲫(*Carassius auratus cuvieri*)♀×鲢♂和鲢♀×鲤♂、鲢♀×鲫♂、鲢♀×白鲫♂的正反交试验。在鲤♀×鲢♂、鲫♀×鲢♂和白鲫♀×鲢♂3个正交组中，胚胎发育基本正常，尽管孵出的鱼苗绝大多数生命力弱，但孵化率都在50%左右；而在鲢♀×鲤♂、鲢♀×鲫♂和鲢♀×白鲫♂3个反交组中，胚胎发育均为畸形，不能孵化出苗。

胚胎发育细胞遗传学分析表明，鲤♀×鲢♂、鲫♀×鲢♂和白鲫♀×鲢♂的杂种胚胎几乎都是整倍体，而鲢♀×鲤♂、鲢♀×鲫♂和鲢♀×白鲫♂的杂种胚胎基本上是非整倍体，染色体数变化较大。这些正反交杂种胚胎发育的显著差异可能与其亲本物种间的基因组大小有关。文中还分析讨论了这些正反交差异与天然多倍体物种以及胚胎发育速度的相关性，认为天然多倍体物种可能具有一些不同于普通二倍体物种协调外源基因组的能力。

关键词：远缘杂交，正反交，基因组大小，非整倍体，多倍体，发育细胞遗传学

杂交是鱼类遗传育种中一个传统而又效果明显的方法，特别是在种间、属间、亚科间和科间等远缘杂交中发现了三倍化（刘思阳等，1987；Beck 等，1983；Kasama 等，1989，1990）、四倍化（吴维新等，1981）、雌核发育（Stanley，1976；蒋一珪等，1982）和雄核发育（Stanley，1976；李传武等，1990）的现象之后，将远缘杂交作为培育纯系和生产多倍体杂种已开始显示出其应用价值（吴维新等，1988；Chevassus，1983；Chevassus 等，1990）。但这些产生特殊发育途径的杂交组合其亲本物种的选配是否具有某些普遍规律？其胚胎发育的机制如何？为了回答这些问题，我们在鲢鱼的杂交育种研究中，以鲢作为父、母本，分别与鲤、鲫和白鲫等进行了正反交杂交试验，在发现正反交的杂种胚胎具有显著的发育差异后，通过胚胎细胞的染色体观察，分析了造成其不同发育命运的发育细胞遗传学机理，首次提出了鱼类杂种胚胎的发育命运与亲本物种间的基因组大小以及天然多倍体物种的相关性。

材 料 与 方 法

一、杂交组合及亲鱼来源 杂交用的鲢、鲤（兴国红鲤、镜鲤、长鳍鲤或黄河鲤）、

---

* 本研究得到中国科学院院长基金的部分资助。
本文1991年8月8日收到，同年10月12日修回。

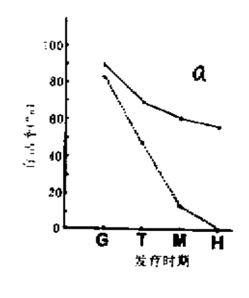
鲫（红鲫或水晶彩鲫）和白鲫均取自本所关桥试验场。鲤、鲫和白鲫采用鲤鱼脑垂体（4mg／kg）进行人工催产，鲢采用垂体加 HCG 和 LRH−A 混合物（0.4mg 垂体+500I.U.HCG+8μgLRHA／kg）进行人工催产。3 个正交组合是鲤♀×鲢♂、鲫♀×鲢♂和白鲫♀×鲢♂，3 个反交组合是鲢♀×鲤♂、鲢♀×鲫♂和鲢♀×白鲫♂。干法授精。

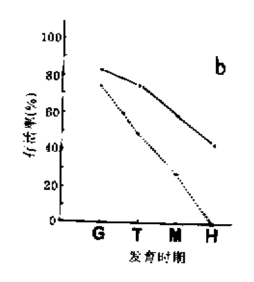
二、胚胎发育观察和存活率统计 分别从各个杂交组合随机取出一定数量（一般为 1000 个左右）的受精卵，置培养皿孵化，在解剖镜下观察其胚胎发育过程，并统计在原肠期、尾芽期、肌节出现期和孵化期的存活率。

三、染色体分析 染色体制片一般在原肠期和尾芽期进行。原肠胚采用多个胚胎混合（约 50 个）制片（桂建芳等，1990）。尾芽胚采用单个胚胎制片（桂建芳等，1990）。此外，还对生长的幼鱼和成鱼进行了尾鳍细胞（桂建芳等，1990）和肾细胞（余先觉等，1989）的染色体观察。

结果

一、正反交杂种胚胎的发育差异 从 1986—1990 年，共进行了 12 组鲤♀×鲢♂、3 组鲢♀×鲤♂、8 组鲫♀×鲢♂、4 组鲢♀×鲫♂、6 组白鲫♀×鲢♂和 4 组鲢♀×白鲫♂的正反交，每组用于杂交的卵数从几千到几万不等。这些杂交试验表现出的显著特征是正反交杂种胚胎的发育命运具有极为显著的差异（图 1—3）。在正交组合中鲤♀×鲢♂、鲫♀×鲢♂和白鲫♀×鲢♂中，胚胎发育基本正常，孵化出苗率都在 50%左右；而在反交组合鲢♀×鲤♂、鲢♀×鲫♂和鲢♀×白鲫♂中，杂种胚胎发育异常，不断死亡，都没有孵化出正常鱼苗。这些反交组合的杂种胚胎在发育早期的囊胚和原肠阶段基本正常，观察不出异常变化。到尾芽期时，已有批量的胚胎死亡。在肌节出现后，仅剩 20%左右的胚胎，且呈现明显的畸变，胚体一般呈圆球形，弯曲在卵黄囊上，大多死于出膜之前；即使有少数能够出膜，最终也因表现出围心腔扩大、胚体弯曲等类似于单倍体综合症（haploid syndrome）（Taniguchi 等，1986）的症状而很快死亡。





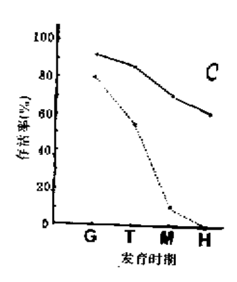


图 1 鱼类远缘杂交正反交杂种胚胎在不同发育时期的存活率

Fig.1 Viability of hybrid embryos at different developmental stages

a: 鲤♀×鲢♂（实线）和鲢♀×鲤♂（虚线） b: 鲫♀×鲢♂（实线）和鲢♀×鲫♂（虚线） c: 白鲫♀×鲢♂（实线）和鲢♀×白鲫♂（虚线） G: 原肠期 T: 尾芽期 M: 肌节出现期 H: 孵化期

二、正交杂种胚胎染色体组成的整倍性　鲤、鲫和白鲫的核型都已有报道（余先觉等，1989；小林弘等，1973），其 2n＝100，配子的染色体数为 50；鲢的核型也已分析(余先觉等，1989)，其 2n＝48，配子的染色体数为 24。在 3 个正交组合鲤♀×鲢♂、鲫♀×鲢♂和白鲫♀×鲢♂的原肠胚混合制片中，90%以上中期相的染色体都是 74（图版Ⅰ：1)，即 50 条源于母本，24 条源于父本，为典型的杂种二倍体。尾芽期单个胚胎的染色体分析（表 1）在鲤♀×鲢♂中共成功鉴定了 31 个胚胎，都是杂种二倍体；在鲫♀×鲢♂中共检测了 29 个胚胎，其中 20 个胚胎的染色体数为 74，为杂种二倍体，2 个胚胎的染色体数为 24，为雄核发育单倍体，1 个胚胎的染色体数为 50，为雌核发育单倍体，1 个胚胎的染色体数为 124，为异源三倍体，1 个胚胎中既含有染色体数为 74 又含有染色体数为 148 左右的中期相，为 2n／4n 镶嵌体，4 个胚胎的染色体数普遍少于 74，在 50—70 之间，为亚二倍体；在白鲫♀×鲢♂中，鉴定的 12 个胚胎都是染色体数为 74 的杂种二倍体。由此可见，在以鲤、鲫和白鲫为母本、鲢为父本的正交组合中，绝大多数胚胎都完整地保留了来自父母本雌雄原核的染色体，为整倍性发育。

表 1　6 个正反交在尾芽期单个胚胎的染色体倍性的鉴定结果

Tab.1　The results of ploidy identification from individual tail-bud embryos of 6 reciprocal crosses

杂交组合	鉴定的胚胎数	倍性水平					
		2n	2n−	1n（♂）	1n（♀）	3n	m
鲤♀×鲢♂	31	31					
鲫♀×鲢♂	29	20	4	2	1	1	1
白鲫♀×鲢♂	12	12					
鲢♀×鲤♂	11		11				
鲢♀×鲫♂	23	1	20				2
鲢♀×白鲫♂	11		10		1		

注：2n—杂种二倍体　2n−—杂种亚二倍体　1n（♂）—雄核发育单倍体　1n（♀）—雌核发育单倍体　3n—杂种三倍体　m—镶嵌体

三、反交杂种胚胎染色体组成的非整倍性　在 3 个反交组合鲢♀×鲤♂、鲢♀×鲫♂和鲢♀×白鲫♂的原肠胚制片中，虽都可找到染色体数为 74 含有父母本完整基因组的中期细胞（图版Ⅰ：2），但非整倍体细胞均占有很大的比例，既有染色体数少于 74 其变化范围从 22—73 不等的亚二倍体或单倍体细胞，又有少数染色体多于 74 的超二倍体细胞(图版Ⅰ：3)。

尾芽期单个胚胎的染色体分析（表 1）表明，3 个反交组合的尾芽胚基本上都是非整倍体。在鲢♀×鲤♂中，鉴定成功的 11 个胚都是亚二倍体，各个胚中细胞间的染色体数变化也很大，一般在 40—60 之间，有些胚中也见有染色体数很少仅 20 几条的中期相，在有些亚二倍体中期相中，还可见到 1—2 个明显小于其它染色体的微小染色体(microchromosome）或染色体片段（chromosome fragment)。在鲢♀×鲫♂中，虽鉴定出了 1 个染色体数为 74 的杂种二倍体，但其余的都是非整倍体，其中两个胚最为复杂、

为镶嵌体，既含有染色体数少于74多于24的亚二倍体细胞、染色体数为24的单倍体细胞和染色体数少于24的亚单倍体细胞，又含有染色体数为140左右的亚四倍体细胞，在中期相中，还可见到一些微小染色体或染色体片段（图版Ⅰ：4—9）。对染色体数为24的中期相进行核型分析表明，它含有9个m染色体，11个sm染色体，4个st染色体（图版Ⅰ：10），恰好为肾细胞核型的一半（余先觉等，1989），确证为鲢的单倍体细胞。在鲢♀×白鲫♂中，鉴定的11个胚有10个是亚二倍体，各个胚内染色体数的变化范围在24—70之间（图版Ⅰ：11—14），另有一个胚为雌核发育单倍体。

四、正交杂种幼鱼的分化 从鲤♀×鲢♂、鲫♀×鲢♂和白鲫♀×鲢♂中孵化出来的幼鱼在开口摄食之后，就开始分化，只有少数个体活动能力强，生长较快；绝大多数反应迟钝，生长缓慢。养殖一个月后，分化极为明显，大型个体类似于母本（占孵出鱼苗的1‰至5‰），小型个体呈中间型，既不象母本又不象父本，为典型的“杂种”，两者的大小相差10倍左右。当这些杂交组合的鱼苗与其它鱼苗混养发塘时，只有生长正常的大型个体能存活下来；小型个体只有在较佳的条件下专池养殖，才能生存下来，但生长缓慢，一龄鱼只能长到5—8cm。染色体分析表明，大型个体中既有异源三倍体，又有异源四倍体，小型个体为杂种二倍体。

讨论

一般认为，鱼类杂交不亲和性产生的原因是双亲基因组间的矛盾，从细胞遗传学的观点来说，就是双亲间的核型愈相近，杂交愈能成功，双亲间核型差异愈大，杂交不亲和性愈强，胚胎发育愈难正常进行（王祖熊等，1986）。鲤、鲫和白鲫的核型与鲢的核型具有很大的差异，鲤♀×鲢♂、鲫♀×鲢♂和白鲫♀×鲢♂的杂种胚胎均能正常发育孵化出苗，而其反交鲢♀×鲤♂、鲢♀×鲫♂和鲢♀×白鲫♂的杂种胚胎发育畸形都不能孵化出苗的相反结果充分表明，鱼类远缘杂交的亲和性还与亲本物种间的基因组大小密切相关。当以鲤、鲫和白鲫这些基因组较大的物种为母本时，不但雌核和卵质能够协调外来的雄核参与发育，细胞分裂正常，保持了细胞的整倍性，而且其多倍体发育的潜能更易实现；当以鲢等基因组较小的物种为母本进行反交时，基因组较小的雌核和卵质难以协调外来的基因组较大的雄核进行正常的卵裂，细胞分裂过程中不断出现染色体的不平衡分离和染色体排除，形成非整倍体，使这些杂种胚胎表现出比单倍体综合症更为严重的畸变，在发育过程中不断死亡。

鲤、鲫和白鲫与鲢这些基因组大小不同物种间的正反交为什么会出现截然不同的胚胎发育命运、表现出如此之大的差异？首先，可从进化遗传学的角度来考虑：许多研究已经证明，鲤、鲫和白鲫都是由2n=50经多倍化演化而成的2n=100的天然多倍体物种（桂建芳等，1985），尽管在进化过程中已发生了二倍化，但由于基因的加倍与重复，仍保持有较强的可塑性（桂建芳，1985），因而其协调外来基因组参与发育的能力也较强，保证了胚胎发育的完成。这在同为天然多倍体物种的鲑科鱼类中也有类似的现象(Chevassus，1983)。由此可见，天然多倍体物种可能具有一些不同于普通二倍体物种协调外来基因组的能力。其次，还可从胚胎发育速度来考虑：鲤、鲫和白鲫的发育速度较慢，鲢的发育速度较快，在水温为24℃左右时，鲤、鲫和白鲫从受精到孵化需要60h左

右，而鲢只需 24h 左右。这种发育速度的差异显然影响了杂种胚胎的发育。然而，为何仅以鲢为母本的反交组合受到影响，使来源于鲤、鲫或白鲫精核的染色体不断排除？叶玉珍等（1989）在草鱼♀×鲤♂的杂种胚胎中也发现了类似的现象，并认为胚胎发育期间的核质不能同步可能是造成染色体丢失的主要原因。以鲤、鲫和白鲫为母本的杂种胚胎能够协调雄核同步分裂，可能是由于鲤、鲫和白鲫的基因组较大，雌核和卵质占有一定的优势，且胚胎的发育速度较慢，这样可以以大控小，以慢制快；而鲢的基因组较小，其雌核和卵质的分裂速度又较快，外来的鲤、鲫或白鲫的较大基因组跟不上其分裂速度，而出现染色体丢失。

本研究结果还表明，鲤鲫鱼类（♀）与鲢（♂）杂交的多倍化发育潜能是值得开发和利用的。几年来，我们已从鲤♀×鲢♂和鲫♀×鲢♂中获得了鲤鱼型和鲫鱼型的异源三倍体个体，并也鉴定到 1 尾异源四倍体。将染色体组操作技术与这些正交组合相配套，已获得批量异源三倍体鱼。

孵化出苗的鲤♀×鲢♂、鲫♀×鲢♂和白鲫♀×鲢♂的杂种二倍体，其细胞分裂是基本正常的。因为养殖了一年的鱼虽生长缓慢，但仍保留了源于父母本的全部染色体；其生命力弱，易于死亡的主要原因可能是基因剂量不足和不等位基因的相互干扰引起的。

图 版 说 明

1. 鲤♀×鲢♂杂种二倍体的中期相，CN＝74
2. 在鲢♀×鲫♂原肠胚制片中观察到的 CN＝74 含有父母本完整基因组的杂种二倍体中期相
3. 在鲢♀×鲫♂原肠胚制片中观察到的 CN＝76 并含有 3 个染色体片段（箭头所示）的超二倍体细胞

4—9. 在鲢♀×鲫♂中发现的一个镶嵌体胚胎的部分中期相：

4. 亚二倍体，CN＝71，并含有 1 个微小染色体（箭头所示）
5. 亚二倍体，CN＝58，并含有 1 个染色体片段（小箭头所示），大箭头示两个染色体的臂间联合
6. 亚二倍体，CN＝31，并含有 1 个染色体片段（箭头所示）
7. 亚单倍体，CN＝23，缺失了 1 个 sm 染色体
8. 亚四倍体，含有约 140 个染色体，并含有一些微小染色体或染色体片段（箭头所示）
9. 单倍体，CN＝24，箭头示图 7 中缺失的 sm 染色体
10. 图 9 鲢鱼单倍体的核型

11—14. 鲢♀×白鲫♂亚二倍体胚胎的中期相：

11. CN＝26，其中 2 条凝缩程度较弱，1 条呈扭曲状，另 1 条呈环状（箭头所示）
12. CN＝32　13.CN＝46　14.CN＝68，箭头示 3 个微小染色体

参 考 文 献

王祖熊，张锦霞，靳光孝. 1986. 鱼类杂交不亲和性的研究. 水生生物学报，**10**（2）：171—179.

叶玉珍，吴清江，陈荣德. 1989. 草鱼和鲤杂交的细胞学研究——鱼类远缘杂交核质不同步现象. 水生生物学报，**13**（3）：234—239.

刘思阳，李素文. 1987. 三倍体草鲂杂种及其双亲的红细胞（核）大小和DNA含量. 遗传学报，**14**（2）：142—148.

李传武，吴维新，徐大义等. 1990. 鲤和草鱼杂交中雄核发育子代的研究. 水产学报，**14** (2): 153—156.

吴维新，林临安，徐大义. 1981. 一个四倍体杂种——兴国红鲤×草鱼. 水生生物学集刊，**7** (3): 433—436.

吴维新，李传武，刘国安等. 1988. 鲤和草鱼杂交四倍体及其回交三倍体草鱼杂种的研究. 水生生物学报，**12** (4): 355—363.

余先觉，周暾，李渝成等. 1989. 中国淡水鱼类染色体.北京：科学出版社.

桂建芳. 1985. 多倍体鱼类的开发和利用. 水库渔业，(3): 53—56.

桂建芳，李渝成，李康等. 1985. 中国鲤科鱼类染色体组型的研究VI.鲃亚科3种四倍体鱼和鲤亚科1种四倍体鱼的核型. 遗传学报，**12** (4): 302—308.

桂建芳，梁绍昌，孙建民等. 1990. 鱼类染色体组操作的研究 I.静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫. 水生生物学报，**14** (4): 336—344.

蒋一珪，俞豪祥，陈本德等. 1982. 鲫鱼的人工和天然雌核发育. 水生生物学集刊，**7** (4): 471—477.

小林弘，越智尚子，竹内直政. 1973. フナ属魚類の染色体の比較研究. 魚類学雑誌，**20** (1): 7—12.

Beck, M. L. and Biggers, C. J. 1983. Erythrocyte measurements of diploid and triploid *Ctenopharyngodon idella* × *Hypophthalmchthys nobilis* hybrids.*J. Fish Biol.*, 22: 497–502.

Chevassus, B. 1983. Hybridization in fish. Aquacultrue, 33: 245–262.

Chevassus, B. and Dorson, M. 1990. Genetics of resistance to disease in fishes. Aquaculture, 85: 83–107.

Kasama, M. and Kobayasi, H. 1989. Hybridization experiment between female crucian carp and male grass carp. Nippon Suisan Gakkaishi, **55**(6): 1001–1006.

Kasama, M. and Kobayasi, H. 1990. Hybridization experiment between *Carassius carassius* and *Gnathopogon elongatus elongatus* Japan. J. Ichthyol., **36**(4): 419–426.

Stanley, J. G. 1976. Production of hybrid,androgenetic and gynogenetic grass carp and common carp. Trans. Am. Fish. Soc., 105: 10–16.

Taniguchi, N., Kijima, A. and Fukai, J. *et al.* 1986. Conditions to induce triploid and gynogenetic diploid in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52**(1): 49–53.

CYTOGENETIC ANALYSIS OF DEVELOPMENTAL DIFFERENCE IN HYBRID EMBRYOS BETWEEN RECIPROCAL CROSSES IN DISTANT HYBRIDIZATION OF FISHES

Gui Jianfang Liang Shaochang Zhu Lanfei Sun Jianmin Jiang Yigui

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan* 430072)

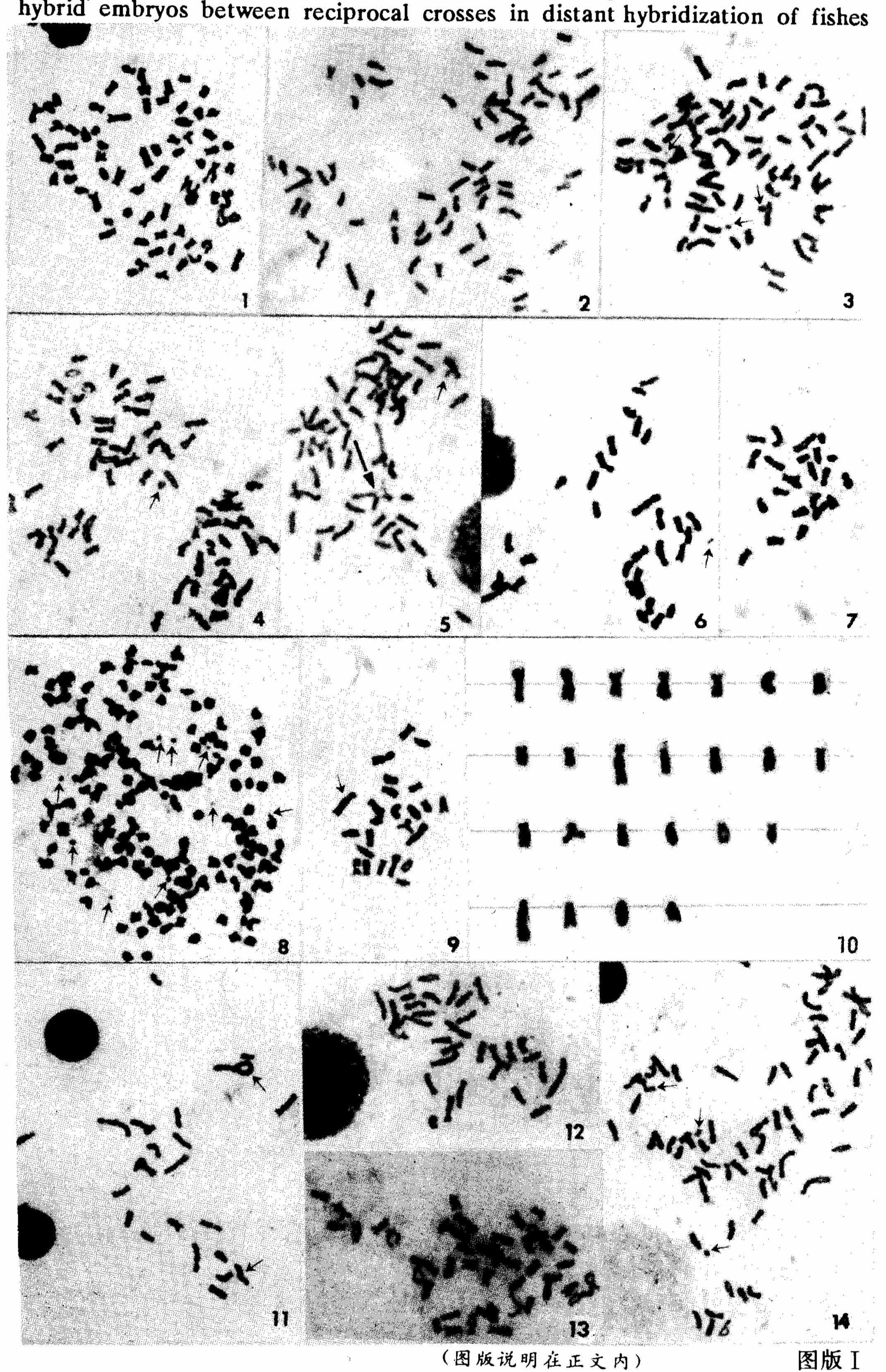
Six reciprocal crosses were performed with common carp (*Cyprinus carpio*)♀ × silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)♂, crucian carp(*Carassius auratus*)♀ × silver carp♂ and white crucian carp(*Carassius auratus cuvieri*)♀ × silver carp♂ as well as silver carp♀ × common carp♂, silver carp♀ × crucian carp♂ and silver carp♀ × white crucian carp♂. The direct hybrid embryos of common carp♀ × silver carp♂, crucian carp♀ × silver carp♂ and white crucian carp♀ × silver carp♂ seemed to develop normally, and about 50%

of the hybrided eggs produced larvae, although the viability of most of the hatched larvae was inferior. The development of the reciprocal hybrid embryos of silver carp♀ × common carp♂, silver carp♀ × crucian carp♂ and silver carp♀ × white crucian carp♂ was abnormal, and the embryos successively died after gastrular stage. No normal hybrid embryos survived to hatching.

Developmental cytogenetic analysis of the hybrid embryos between the reciprocal crosses showed that the direct embryos of common carp♀ × silver carp♂, crucian carp♀ × silver carp♂ and white crucian carp♀ × silver carp♂ were almost euploids, containing 74 chromosomes of 50 originated from maternal species and 24 from paternal species, whereas the reciprocal hybrid embryos of silver carp♀ × common carp♂, silver carp♀ × crucian carp♂ and silver carp♀ × white crucian carp♂ were basically aneuploids. The chromosome number observed from the reciprocal gastrular embryos varied considerally, usually ranging from 24 to 74, and a few of cells in which the chromosome number was less than 24 or more than 74 were also observed. The chromosome analysis of individual tail bud embryos revealed that most of the reciprocal hybrid embryos were hypodiploids, within which the loss of chromosomes had heavily occurred.

The significant difference in embryonic development between the reciprocal crosses suggesed that the developmental fate of hybrid embryos might be related to the genome size between parental species. When the genome of maternal species was larger than that of paternal species, female nucleus and egg cytoplasm could not only coordinate male nucleus to engage in synchronus cell division and to preserve euploidy, but also bring about the potentiality of polyploid embryogenesis more easily. When the genome of maternal species was smaller than that of paternal species, female nucleus and egg cytoplasm had no the ability of harmonizing male nucleus to carry out synchronus development, and the aneuploid embryos were formed by chromosome elimination owing to asynchronus division and imbalancing segregation. The relationship between the difference of reciprocal crosses in distant hybridization of fishes and the natural polyploid species as well as the rate of embryonic development were analysed and discussed. Considerating the difference of reciprocal crosses and the potentiality of polyploidy, we suppose that the natural polyploid species, such as common carp, crucian carp and white crucian carp, might have the potential capability of coordinating foreign allogenome, which is different from ordinary diploid species.

Key words: Distant hybridization, Reciprocal crosses, Genome size, Aneuploid, Polyploid, Developmental cytogenetics



（图版说明在正文内）

图版 I